



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 11 102 A 1

51 Int. Cl.⁷:
C 09 B 62/36

21 Aktenzeichen: 199 11 102.2
22 Anmeldetag: 12. 3. 1999
43 Offenlegungstag: 14. 9. 2000

DE 199 11 102 A 1

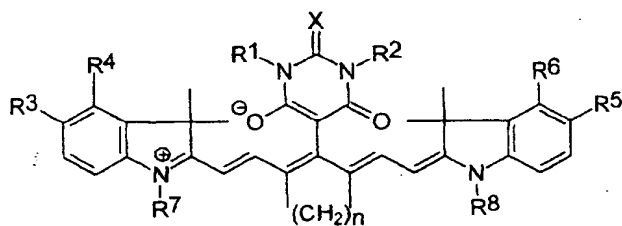
71 Anmelder:
FEW Chemicals GmbH Wolfen, 06766 Wolfen, DE

74 Vertreter:
v. Bezold & Sozien, 80799 München

72 Erfinder:
Reiner, Knut, Dr., 06766 Wolfen, DE; Ernst, Steffen,
Dr., 04103 Leipzig, DE; Mustroph, Heinz, Dr., 06844
Dessau, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- 54 Cyanin-Farbstoffe
57 Es werden Cyanin-Farbstoffe beschrieben, die Barbitur-
säure- oder Thiobarbitursäure-Substituenten und reakti-
ve Gruppen aufweisen, die zur Bindung an Trägersub-
stanzen ausgebildet sind.



Neute cl. 2 e 3

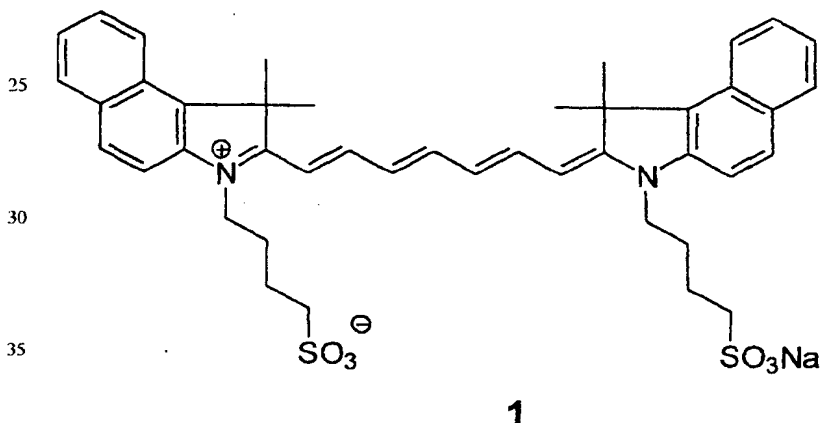
80

DE 199 11 102 A 1

Die Erfindung betrifft Cyanin-Farbstoffe für die Anwendung als Fluoreszenzmarker im nahen Infrarot-Bereich um 780 nm (NIR; Near Infrared Region), die stabil und in Wasser löslich sind, eine gute Fluoreszenzquantenausbeute haben und mit einer oder mehreren Reaktivgruppen versehen sind.

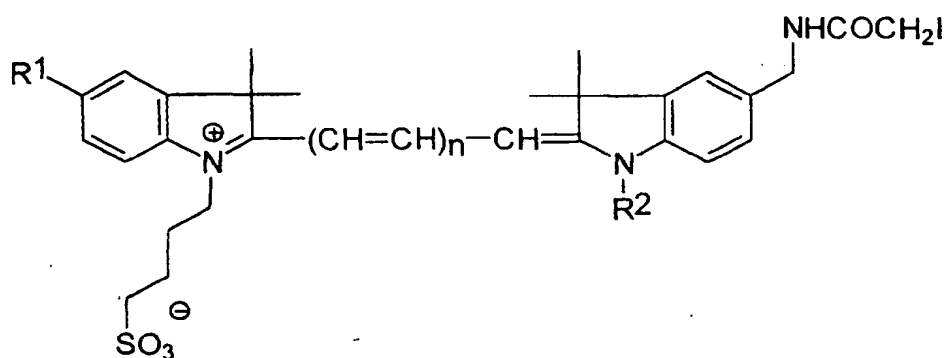
Es ist allgemein bekannt, daß Fluoreszenzfarbstoffe als Marker auf vielfältige Weise für die Analyse eines Großteils klinisch, biologisch, biochemisch oder chemisch relevanter Substanzen wie z. B. Zellen, Antikörper, Proteine, Hormone, Nucleinsäuren, Kohlehydrate oder Amine und Mercaptane eingesetzt werden. Sowohl die entsprechenden Analyse- als auch die Detektionstechniken unterliegen derzeit einer schnellen Entwicklung. In Kombination mit der leicht detektierbaren, durch Laser induzierten Fluoreszenz (LIF; Laser-Induced Fluorescence), sind bereits schnelle Analysen in den o. a. Gebieten möglich. Ein wesentliches Ziel dabei ist es, die Nachweisgrenze immer weiter herabzusetzen. Voraussetzung dafür ist eine geringe Untergrundfluoreszenz (Eigenfluoreszenz von Begleitstoffen, Lösungsmittel), Lichtstreuung (Rayleigh-, Tyndall- und Raman-Streuung) und Fluoreszenzlöschung. Besonders bei klinisch und biologisch bedeutenden Anwendungen treten diese Effekte, bedingt durch den kolloidalen Charakter vieler Biomoleküle, verstärkt auf. Gegenüber der Analytik im sichtbaren Spektralbereich, tritt dieser Einfluß im Nahen Infrarot (NIR) nicht oder nur in geringer Form auf. Mit der Entwicklung preiswerter und langweiliger Laserdioden (780 nm) waren für die Nachweistechнологie im NIR die von der technischen Seite notwendigen Voraussetzungen prinzipiell vorhanden.

Farbstoffe, die im NIR-Bereich absorbieren, sind insbesondere aus der Silberhalogenidphotographie bekannt. Eine der ersten Arbeiten, in der ein NIR-Farbstoff für bioanalytische Anwendungen eingesetzt wurde, geht zurück auf Sauda et al. ("Anal. Chem." 58 (1986) 2649), die Indocyaningrün (ICG) 1 ($\lambda_{\text{max}} = 785 \text{ nm}$; MeOH) für die Proteinanalyse in Human Serum verwendeten und damit die Nachweisempfindlichkeit um zwei Größenordnungen steigern konnten.



Dieser Farbstoff hat jedoch die folgenden Nachteile. Er kann nur durch physikalische Effekte an die Probe gebunden werden (nicht-kovalente Bindung), was während der chromatographischen Separation der Probe zu einer teilweisen Abtrennung des Farbstoffes führt. Trotz dieses schwerwiegenden Problems waren damit die Vorteile von NIR-Fluoreszenzmarkern eindrucksvoll demonstriert. Es folgten Arbeiten, um NIR-Fluoreszenzmarker mit Reaktivgruppen für den Bereich um 780 nm zu synthetisieren.

Als Reaktionspartner stehen bei Antikörpern, Proteinen, Hormonen, Nucleinsäuren, und anderen Biomolekülen u. a. Mercapto-(-SH), Amino- (-NH₂), Hydroxy- (-OH) und Aldehydgruppen (-CHO) zur Verfügung. Einer der ersten Ansätze in der Synthese von Cyaninfarbstoffen mit Reaktivgruppen bestand in der Verwendung von Iodacetamidogruppen gemäß dem Farbstoff 2 [Ernst et al. ("Cytometry" 10 (1989) 3)]. Diese Gruppe war prinzipiell geeignet, weist aber noch viele Einschränkungen auf. So reagiert sie nur mit Mercaptogruppen und nicht mit Amino- oder Hydroxygruppen. Das ist ein wichtiger Nachteil, da z. B. viele Proteine keine genügende Anzahl von Mercaptogruppen aufweisen und andere Biomoleküle keine haben. Hinzu kommt als zweiter Nachteil, daß Mercaptogruppen (-SH HS-) in Gegenwart von Sauerstoff leicht zu Disulfiden (-S-S-) oxidieren und von daher unter Lufteinfluß für kovalente Bindungen an den Fluoreszenzmarker nicht mehr oder nur in geringem Umfang zur Verfügung stehen.



2

R1

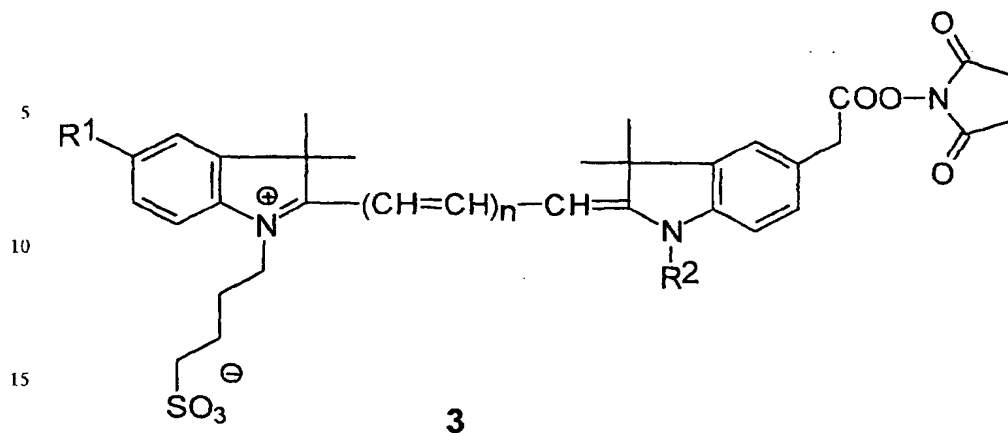
R 2

a H

CH₃b CH₂NHCOCH₂I, (CH₂)₄SO₃Na

Mit $n = 3$ erhält man Absorptionsmaxima um 760 nm. Abgesehen von den Einschränkungen bei der Verwendung von Iodacetamidogruppen, sind Farbstoffe mit $n = 3$ nicht sehr stabil und aufgrund ihrer relativ geringen Wasserlöslichkeit neigen sie in wässrigen Systemen zur Bildung von Farbstoffaggregaten (Erscheinen der kürzerwelligen Dimeren- oder H-Bande), die wesentlich schlechter fluoreszieren. Die Tendenz, Farbstoffaggregate zu bilden, korreliert auch mit der Tendenz zu unspezifischen nicht-kovalenten Bindungen des Farbstoffes an das Biomolekül. Aus diesen drei Gründen sind Farbstoffe der Struktur 2 wenig geeignet.

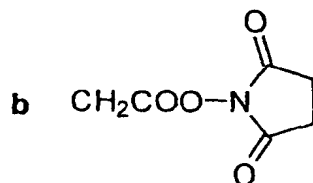
In Proteinen oder anderen Biomolekülen sind gegenüber den Mercaptogruppen sehr viele Aminogruppen enthalten und können als Alternative zu den Mercaptogruppen herangezogen werden. Ein entscheidender Schritt gelang mit der Synthese von Farbstoffen mit Methylencarboxygruppen durch Southwick et al. ("Cytometry" 11 (1990) 418), die man z. B. durch Umsetzung mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) in ihre N-Succinimidester 3 umwandeln kann, die dann wiederum sehr gut mit Aminogruppen reagieren.



R1

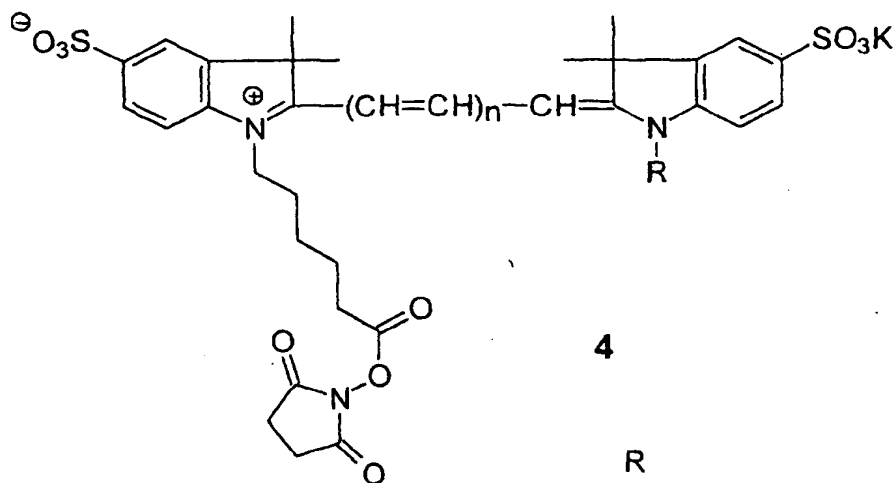
R2

a H

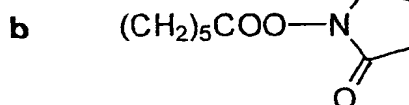
C₂H₅(CH₂)₄SO₃Na

35 Das war schon ein wesentlicher Vorteil der Farbstoffe 3 gegenüber denen mit der Struktur 2. Die Probleme der Stabilität waren damit jedoch noch nicht gelöst.

Die Farbstoffaggregation und die unspezifische nicht-kovalente Bindung der Farbstoffe an die Probe in wässrigen Medien, kann durch eine bessere Wasserlöslichkeit des Farbstoffes verhindert werden. Bereits aus der Photographie ist bekannt, daß Arylsulfogruppen gegenüber N-Alkylsulfogruppen zu einer deutlichen Verbesserung der Wasserlöslichkeit eines Farbstoffes führen. Entsprechende Fluoreszenzmarker wurden erstmals von Mujumdar et al. ("Bioconjugate Chem." 4 (1993) 105) beschrieben.

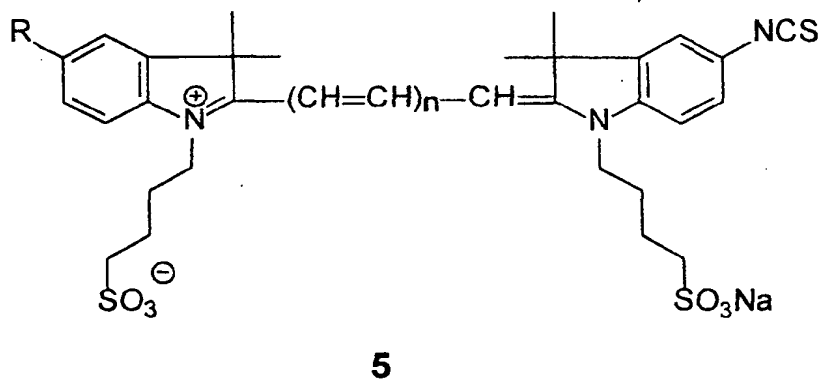


a C_2H_5



Die Farbstoffe 4 werden unter der Marke CyTM von der Firma Amersham Life Science Inc. vertrieben (siehe auch <http://www.amersham.com/life/cydye>). Mit Cy3TM (4; n = 1) hat man Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum um 560 nm, mit Cy5TM (4; n = 2) mit einem Absorptionsmaximum um 660 nm. Für die Laserdioden mit einer Emission um 780 nm ist aus der CyTM-Reihe Cy7TM verfügbar (4; n = 3), das ein Absorptionsmaximum um 760 nm aufweist. Mit diesem Farbstoff werden die Probleme, die aus der Wasserlöslichkeit resultieren, umgangen. Als gravierender Nachteil bleibt, daß der Farbstoff Cy7TM für viele Anwendungen nicht ausreichend stabil ist.

Neben den Succinimidestern als Reaktivgruppe für Aminogruppen wird schon seit längerer Zeit auch der Weg über die Isothiocyanatgruppe verfolgt [Mujumdar et al. ("Cytometry" 10 (1989) 11)].



a H

b NCS

Ähnlich wie bei den Farbstoffen 2, 3 und 4 ist es auch mit Farbstoff 5 (n = 3) möglich, Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum um 760 nm zu erhalten. Neben den bereits bei den Farbstoffen 2 und 3 diskutierten Problemen der Wasserlöslichkeit und Stabilität, kommt hier ein weiterer Nachteil hinzu: die Reaktion der Isothiocyanatgruppe mit der Ami-

nogruppe führt zu nicht sehr stabilen Thioharnstoffderivaten.

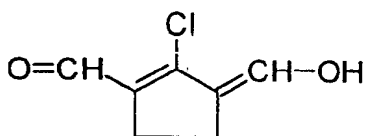
Die Farbstoffe 3, 4 und 5 können prinzipiell auch zur DNA-Sequenzanalyse verwendet werden. Allerdings muß man dazu in einem zusätzlichen Schritt am 5'-Hydroxy-Ende des synthetischen Oligonucleotids (Sequenzierprimer, Primer) oder an den Nucleotiden über einen sog. Amino-Linker $R-(CH_2)_n-NH_2$ (R = Reaktivgruppe, die mit der OH-Gruppe reagiert; $-(CH_2)_n$ Spacer) eine Aminogruppe einführen, die wiederum mit dem NHS-Ester der Carboxygruppe des Farbstoffes reagiert und so den Farbstoff am Oligonucleotid fixiert [Yu et al. ("Nuc. Acids Res." 20 (1992) 83)]. Das Konjugat zwischen Farbstoff und Oligonucleotid, verbunden über den Amino-Linker, wird dann isoliert und gereinigt. Die Gesamtzeit zur Markierung z. B. eines Oligonucleotids aus 20 Basen beträgt nach dieser Methode ca. 2 Tage.

Ein wesentlicher Fortschritt wurde durch Verwendung von N-Hydroxypropylgruppen am Farbstoff erreicht. Die Hydroxygruppe wird mittels der phosphitylierenden Verbindung Bis-(N,N-di-isopropyl)- β -cyanoethyl-phosphordiamidit in das Bis-(N,N-di-isopropyl)- β -cyanoethyl-phosphoramidit umgewandelt (US-A 5 556 959), das direkt mit dem 5'-Ilydroxy-Ende des Oligonucleotids reagiert. Damit reduzieren sich die Reaktionsschritte, die Ausbeute an markiertem Produkt ist größer, die Reinigung einfacher und die benötigte Zeit verringert sich von 2 Tagen auf 5 Stunden.

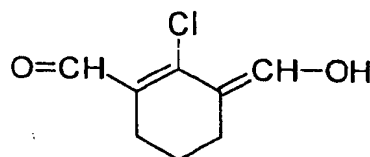
Allerdings wurden nur die Synthese von Tri- und Pentamethincyaninen mit dieser Reaktivgruppe beschrieben, letztere mit einem Absorptionsmaximum um 645 nm und keine Heptamethincyanine.

Generell weisen Cyaninfarbstoffe mit größer werdender Länge der Polymethinkette eine fallende Stabilität auf. Es gab einige Versuche, das Problem der Stabilität durch den Einbau von Ringsystemen in die Polymethinkette zu lösen.

Literaturbekannt für die Synthese von stabilisierten Cyaninfarbstoffen ist die Verwendung von 2-Chlor-1,3-dialdehyden, 6 und 7, die durch Vilsmeier-Synthese aus Cyclopentanon und Cyclohexanon zugänglich sind.



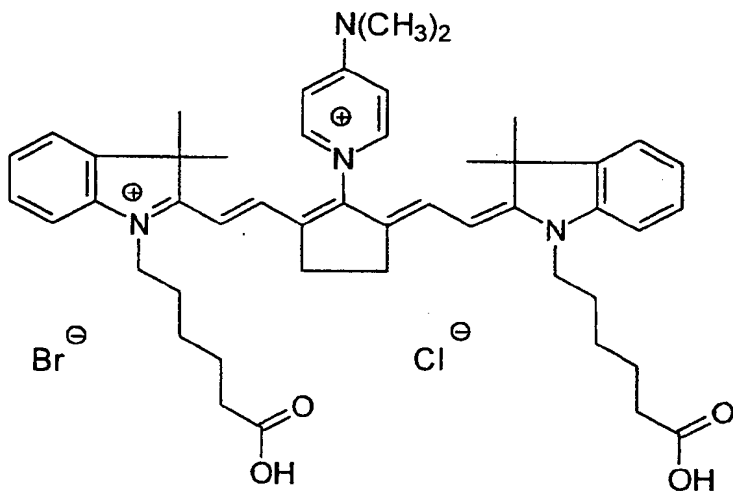
6



7

Allerdings ist das Chloratom in der Polymethinkette des Farbstoffes reaktiv, so daß entsprechende Farbstoffe zwar vom Farbstoffgrundkörper her stabiler als offenkettige Cyanine sind, doch durch die leichte nucleophile Substitution des Chloratoms ein weiteres Stabilitätsproblem hinzu kommt.

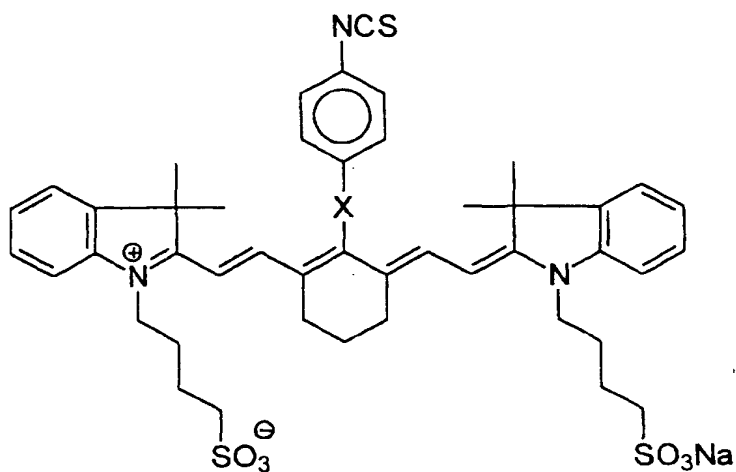
Zur Umgehung dieses Problems wurden Farbstoffe mit einem iminiumsubstituierten Ring in der Polymethinkette synthetisiert (US-A 5 453 505) wie z. B. 8.



8

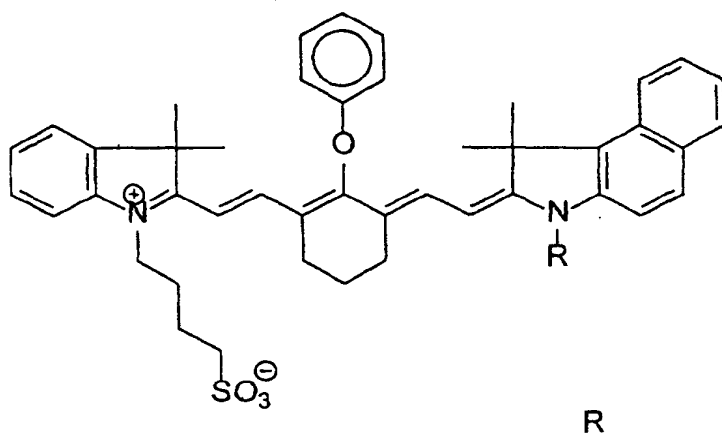
Das Iminium-Kation erhöht die Stabilität des Farbstoffes gegenüber Licht im Vergleich zum Chlor-Farbstoff und führt zu einer gewissen Wasserlöslichkeit und damit zur Verringerung der Aggregatbildung.

Einen anderen Versuch, das Farbstoffstabilitätsproblem zu lösen, stellen Farbstoffe der Struktur 9 [Strekowski et al. ("J. Org. Chem." 57 (1992) 4578)] dar. Damit werden Absorptionsmaxima von 768 nm ($X = O$) und 795 nm ($X = S$) erreicht. Mit $X = O$ wird dieser Farbstoff von LI-COR Inc. unter IRD 40™ angeboten (<http://www.licor.com/bio>).



9

Mit diesen Farbstoffen sind jedoch zwei neue Stabilitätsprobleme gegenüber Cy7TM verbunden. Das erste liegt in der Stabilität der Bindung X. Mit X = S erhält man einen Farbstoff, der sehr leicht hydrolysiert [Shealy et al. ("Anal. Chem." 67 (1995) 247)]; etwas stabiler ist die Etherbindung X = O, aber immer noch ziemlich hydrolyseempfindlich. Das zweite, bereits oben erwähnte, Stabilitätsproblem resultiert aus der als Reaktivgruppe verwendeten Isothiocyanatgruppe, deren Reaktionsprodukt mit Aminogruppen ebenfalls hydrolyseempfindlich ist. Das Problem der Etherspaltung wird auch nicht durch die Farbstoffe 10a und 10b, gelöst, die unter IRD 41TM bzw. IRD 800TM angeboten werden (<http://www.lifecor.com/bio>).



R

a (CH₂)₃NCSb (CH₂)₅CH₂OH

10

Zusammenfassend ist somit festzustellen, daß zwar für eine Bezugswellenlänge von 780 nm (z. B. einer Laserdiode) mit Cy7TM, IRD 40TM, IRD 41TM und IRD 800TM Farbstoffe verfügbar sind, diese aber nicht alle Anforderungen an die Stabilität erfüllen und geringe Fluoreszenzquantenausbeuten aufweisen.

Es ist die Aufgabe der Erfindung, neue Farbstoffe anzugeben, die die oben genannten Nachteile nicht aufweisen und die insbesondere stabil und in Wasser löslich sind, eine gute Fluoreszenzquantenausbeute haben, eine oder mehrere Reaktivgruppen aufweisen, und für die Anwendung als Fluoreszenzmarker im nahen Infrarot-Bereich um 780 nm geeignet sind.

Diese Aufgabe wird durch Cyanin-Farbstoffe mit den Merkmalen gemäß Anspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Verwendungen erfindungsgemäßer Cyanin-Farbstoffe ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Die Grundidee der Erfindung besteht darin, durch die Einführung neuer Substituenten, die Nachteile, insbesondere die geringe Stabilität und Fluoreszenzquantenausbeute, der herkömmlichen Farbstoffe zu beseitigen.

Die Absorption der Cyaninfarbstoffe wird wesentlich bestimmt durch die Anzahl der Methingruppen, die die Polymethinkette bilden. Mit zunehmender Anzahl der Methingruppen wird die Absorption bathochrom verschoben. Heptamethinfarbstoffe (7 Methingruppen bilden die Polymethinkette) haben ein Absorptionsmaximum um 740 nm. Dieses Ab-

sorptionsmaximum reicht nicht aus, damit solche Farbstoffe durch Laserdioden mit einer Emissionswellenlänge um 780 nm zur Fluoreszenz angeregt werden können. Werden zur Farbstoffsynthese anstelle des Glutacondialdehyds die beiden cyclischen Dialdehyde 6 und 7 verwendet, erhält man Farbstoffe mit einem Absorptionsmaximum zwischen 780 und 800 nm, die die Anforderung an die Absorption bereits erfüllen.

- 5 Allerdings tauscht das Chloratom in diesen Farbstoffen relativ leicht gegen Nucleophile aus, so daß diese Farbstoffe nicht als Fluoreszenzmarker verwendet werden können. Wie bereits oben ausgeführt, löst man dieses Problem auch nicht durch den Austausch des Chloratoms gegen Phenol oder Thiophenol.

- Erfindungsgemäß wird die o. a. Aufgabe durch den Austausch des Chlors gegen Barbitursäuren bzw. Thiobarbitursäuren gelöst. Solche Farbstoffe sind wesentlich beständiger gegen nucleophilen Austausch. Ferner zeigen sie vorteilhafterweise die gewünschte Absorption mit Maxima oberhalb 760 nm, insbesondere zwischen 780 und 820 nm und eine effektive Fluoreszenz.

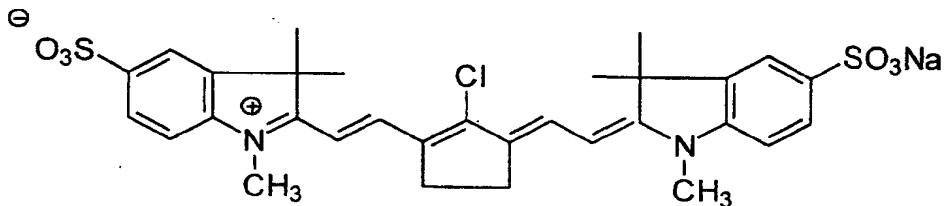
Durch die Substitution, die zu einer Innersalzbildung führt, wird die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe gegenüber den entsprechenden Farbstoffen mit dem Chloratom in Wasser etwa verdoppelt. Die Wasserlöslichkeit kann beliebig durch Substitution mit Sulfonsäuregruppen erhöht werden.

- 15 In jedem Farbstoff können zwei oder eine reaktive Gruppe sein, vorzugsweise die N-Hydroxysuccinimid-Ester der Alkylcarboxygruppe oder das Bis-(N,N-di-isopropyl)- β -cyanoethylphosphoramidit der Alkylhydroxygruppe, die zur kovalenten Bindung an die zu markierende Komponente führen.

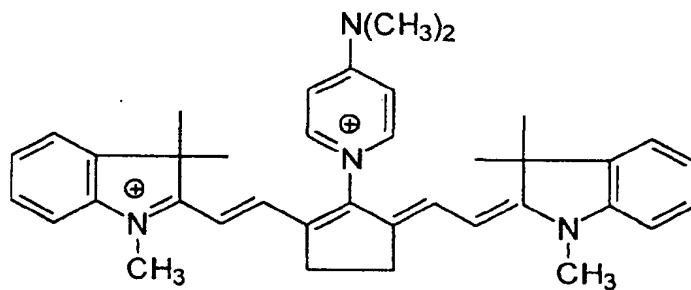
Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

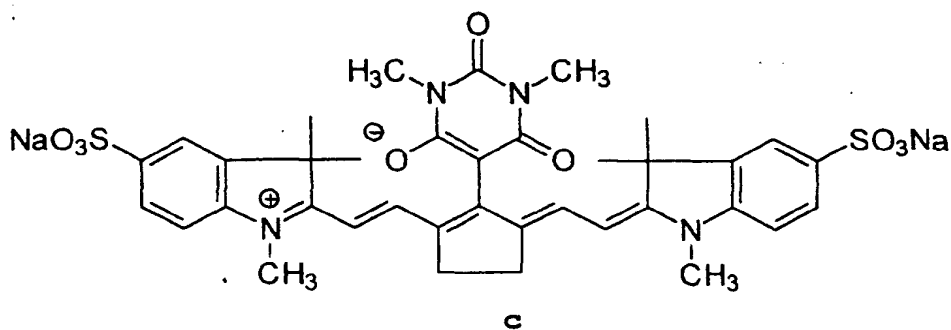
Zum Vergleich der Hydrolyseempfindlichkeit erfindungsgemäßer Farbstoffe (c) mit herkömmlichen Farbstoffen (a, b) wurden 0,01%ige gepufferte wäßrige Lösungen mit pH = 10,5 der Modellfarbstoffe a-c hergestellt und bei 23°C in einem abgedunkelten Gefäß aufbewahrt. In Abhängigkeit von der Lagerzeit wurde die Extinktion gemessen. Vom Logarithmus der normalisierten Extinktion [$\ln(E/E_0)$] und der Lagerzeit wurde eine Korrelation durchgeführt und daraus die Halbwertszeit des Farbstoffes $t_{1/2}$ berechnet (Tab. 1). Die Zeit $t_{1/2}$ dient als Maß für die Hydrolyseempfindlichkeit des Farbstoffes.



a



b



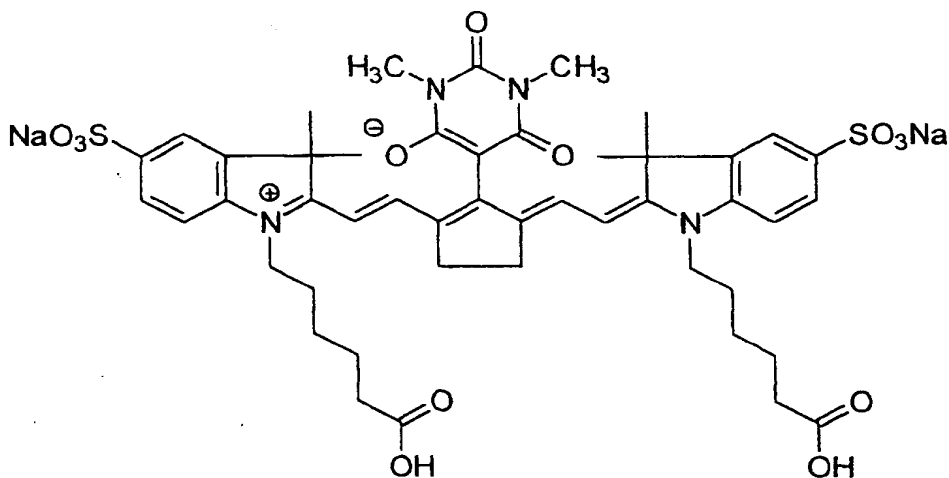
Tab. 1 Halbwertszeiten der Hydrolyse der Farbstoffe a-c in gepufferter wäßriger Lösung mit pH = 10,5

Farbstoff	$t_{1/2}$ [h]
a	2
b	13
c	56

Das in Tab. 1 zusammengestellte Ergebnis zeigt die hervorragende Hydrolysebeständigkeit und damit Stabilität des erfindungsgemäßen Farbstoffs.

Beispiel 2

5-[2,5-Bis-[2-(1-carboxypentyl-3,3-dimethyl-5-sulfo-1,3-dihydro-indol-2-yliden)-ethyliden]-cyclopentyliden]-1,3-dimethyl-pyrimidin-2,4,6-trion, Dinatriumsalz



A) Natriumsalz des 3-(5-Carboxypentyl)-1,1,2-trimethyl-5-sulfoindoliumbromids

2,61 g Natriumsalz des 1,1,2-Trimethyl-5-sulfoindolenin und 2,1 g 6-Bromhexansäure werden in Substanz 2 h bei einer Badtemperatur von 110°C unter Rühren zur Reaktion gebracht. Nach beendeter Reaktion wird der ölige Rückstand mehrmals mit Aceton versetzt, bis ein pulveriger Feststoff zurückbleibt.

B) 1-Carboxypentyl-2-[2-[2-chloro-3-[(1-carboxypentyl-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-sulfo-2H-indol-2-yliden)-ethyliden]-1-cyclopenten-1-yl]-ethenyl]-3,3-dimethyl-5-sulfo-3H-indolium hydroxide, Innersalz, Natriumsalz

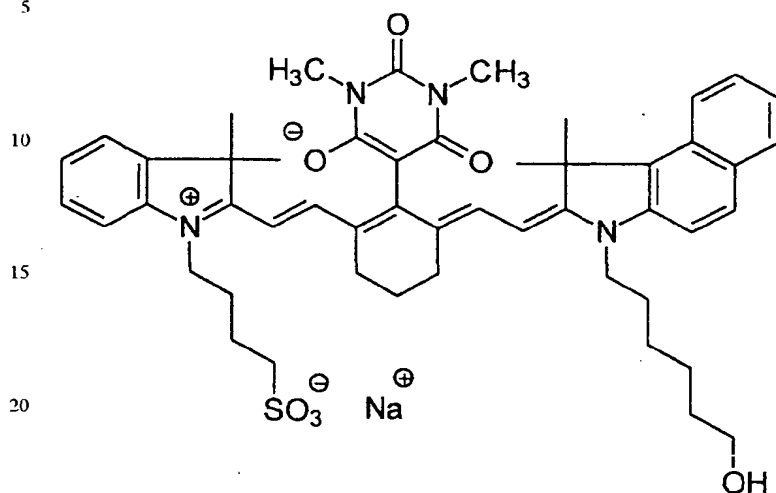
2,28 g Quartärsalz aus A) und 0,47 g 2-Chlor-3-dimethylaminomethylencyclopent-1-encarbaldehyd werden in 15 ml Ethanol in Gegenwart von je 1,5 ml Acetanhydrid und Triethylamin 20 Minuten am Rückfluß erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird mit Ethylacetat gefällt. ($\lambda = 809$ nm)

C) 5-[2,5-Bis-[2-(1-carboxypentyl-3,3-dimethyl-5-sulfo-1,3-dihydro-indol-2-yliden)-ethyliden]-cyclopentyliden]-1,3-dimethyl-pyrimidin-2,4,6-trion, Dinatriumsalz

2,13 g des Farbstoffs aus B) werden in 10 ml DMF gelöst, dazu gibt man schnell eine Suspension aus 0,04 g Natriumhydrid und 1,3-Dimethylbarbitursäure in DMF. Nach 10 minütiger Reaktionszeit wird filtriert und der Farbstoff durch Etherzusatz zur Fällung gebracht. ($\lambda = 789$ nm)

Beispiel 3

5-[-2-(3-(6-Hydroxyhexyl)-1,1-dimethyl-1,3-dihydrobenzo[e]indol-2-yliden)-ethyliden]-6-[-2-(3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-1,3-dihydro-indol-2-yliden)-ethyliden]-cyclohexyliden]-1,3-dimethyl-pyrimidin-2,4,6-trion, Natriumsalz



A) 2-[-2-(2-Chlor-3-[2-(1,3-dihydro-3-(6-hydroxyhexyl)-1,1-dimethyl-2H-benzo[e]indol-2-yliden)-ethyliden]-1-cyclohexen-1-yl)-ethenyl]-3,3-dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indoliumhydroxid, Innersalz

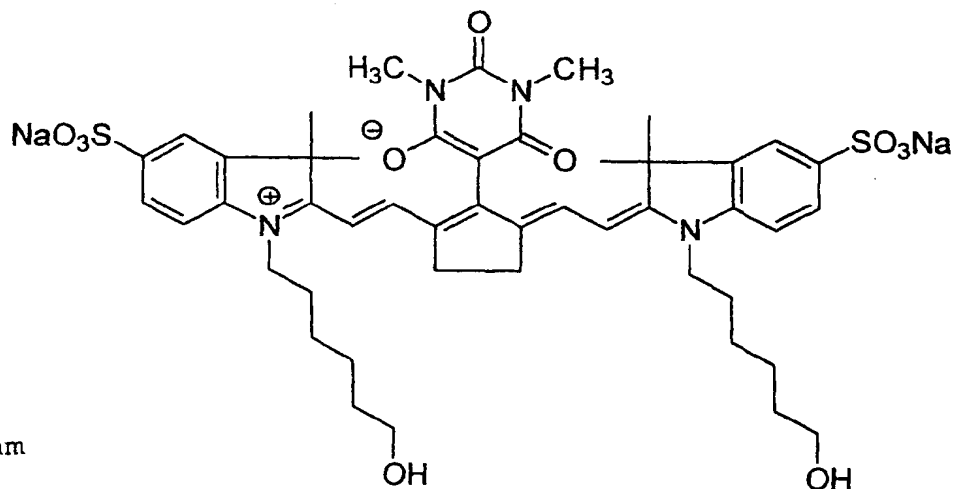
4,37 g 1,1,2-Trimethyl-3-(6-hydroxyhexyl)-1H-benzo[e]indoliumjodid und 1,72 g Chlor-3-hydroxymethylencyclohex-1-encarbaldehyd werden in 150 ml eines Gemisches aus 1-Butanol und Benzen (7 : 3) am Wasserabscheider erhitzt, bis kein Wasser mehr übergeht (ca. 4 h). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird von unlöslichen Rückständen filtriert. Danach gibt man 2,95 g 2,3,3-Trimethyl-1-(4-sulfobutyl)-3H-indolium-Innersalz zu und erhitzt weitere 20 h am Rückfluß. Nach beendeter Reaktion wird eingeeengt und der Rückstand über Kieselgel säulenchromatographisch gereinigt ($\lambda = 803$ nm).

B) 5-[-2-(3,3-Dimethyl-1-(4-sulfobutyl)-1,3-dihydro-indol-2-ylidene)-ethylidene]-6-[-2-[1-(6-hydroxyhexyl)-3,3-dimethyloctahydro-indol-2-ylidene]-ethylidene]-cyclohexylidene)-1,3-dimethyl-pyrimidine-2,4,6-trione

1,85 g des Farbstoffes aus A) werden in 15 ml DMF gelöst. Dazu gibt man eine Suspension aus 0,3 g 1,3-Dimethylbarbitursäure und 0,045 g Natriumhydrid in DMF. Es wird 8 Stunden bei Raumtemperatur unter Feuchtigkeitsausschluß gerührt. Nach beendeter Reaktion wird der Farbstoff durch Zugabe von Diethylether ausgefällt ($\lambda = 779$ nm).

Beispiel 4

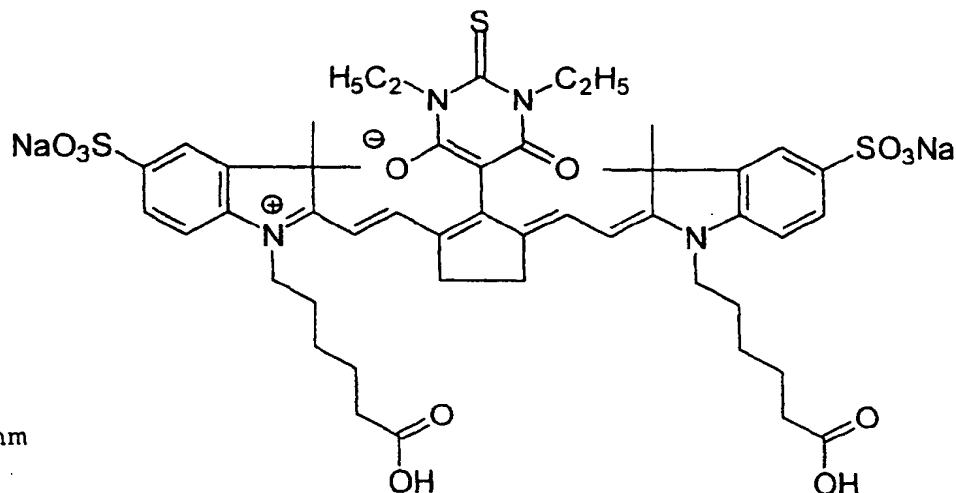
Der folgende Farbstoff wurde nach den in Beispiel 2 angeführten Methoden unter Einsatz der entsprechenden Zwischenprodukte erhalten.



$\lambda = 789$ nm

Beispiel 5

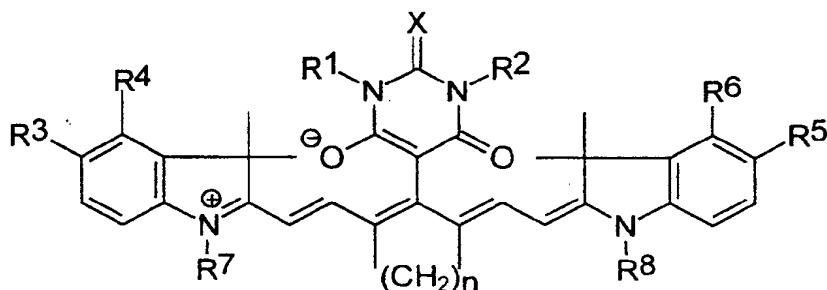
Der folgende Farbstoff wurde nach den in Beispiel 2 angeführten Methoden unter Einsatz der entsprechenden Zwischenprodukte erhalten.



$\lambda = 793 \text{ nm}$

Patentansprüche

1. Cyanin-Farbstoff, **gekennzeichnet durch** einen Barbitursäure- oder Thiobarbitursäure-Substituenten und reaktive Gruppen, die zur Bindung an Trägersubstanzen ausgebildet sind.
2. Cyanin-Farbstoff gemäß Anspruch 1, gekennzeichnet durch die allgemeine Struktur



mit:

$n = 2, 3;$

$R^1, R^2 =$ gleich oder verschieden Wasserstoff oder Alkyl mit 1 bis 8 Kohlenstoffatomen

$R^3, R^4 =$ Wasserstoff, HO_2S , NaO_3S , KO_3S oder die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH-Gruppen;

$R^5, R^6 =$ Wasserstoff, HO_3S , NaO_3S , KO_3S oder die zur Vervollständigung eines Benzenringes notwendigen vier CH-Gruppen;

$R^7, R^8 =$ gleich oder verschieden Alkyl mit 1 bis 4 Kohlenstoffatomen, Sulfoalkyl mit 3 oder 4 Kohlenstoffatomen, $(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, $(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ mit $m = 3-6$, die N-Hydroxysuccinimid-Ester der Carboxygruppe und das Bis-(N,N-di-isopropyl)- β -cyanoethyl-phosphoramidit der Hydroxygruppe;

$X = \text{O}, \text{S}.$

3. Cyanin-Farbstoff nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß

$R^7, R^8 =$ gleich oder verschieden, die N-Hydroxysuccinimid-Ester der Carboxygruppe $(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ mit $m = 3-6$ und das Bis-(N,N-di-isopropyl)- β -cyanoethyl-phosphoramidit der Hydroxygruppe $(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$ mit $m = 3-6$ bedeuten.

4. Verwendung eines Farbstoffs gemäß Anspruch 1 oder 2 als Fluoreszenzmarker im nahen Infrarot-Bereich.

- Leerseite -